

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020020019325 A
(43)Date of publication of application: 12.03.2002

(21)Application number: 1020000052504
(22)Date of filing: 05.09.2000

(71)Applicant: POSCO
POSTECH FOUNDATION
(72)Inventor: MUN, JUNG HO
PARK, JUN WON
SIM, JEO YEONG

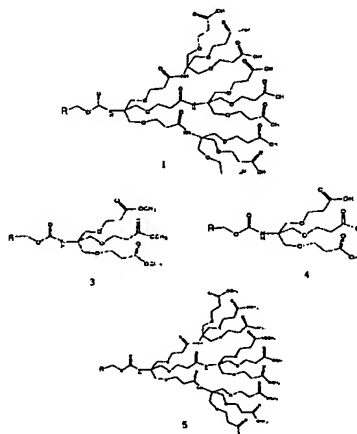
(51)Int. Cl. C07C 271 /12

(54) SUBSTRATE PROVIDED AT ITS SURFACE WITH MOLECULE LAYER HAVING CONTROLLED DENSITY AND SPACE OF AMINE GROUP AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a substrate provided at its surface with a molecule layer having a controlled density and space of amine group which can be used in manufacturing a DNA chip or biochip and other surface studies, and a method for producing the same.

CONSTITUTION: The substrate is produced using a compound of formula 1, in which R is a phenyl or a phenyl substituted with nitro, halogen, or cyano, naphthyl or anthryl. The representative compound of formula 1 is N-CBZ- α -amino- β -acid compound. The compound of formula 1 is produced by a method comprising steps of (a) producing tris-(cyanoethoxy)methyl aminomethane by reacting tris(hydroxymethyl)aminomethane and acrylonitrile via cyanoethylation, (b) producing tris-(carboxyethoxy)ethylmethylaminomethane by adding concentrated hydrochloric acid to tris-(cyanoethoxy)methylaminomethane, followed by refluxing, (c) producing tris-((methoxycarbonyl)ethoxy)methylaminomethane by adding methanol to tris-(carboxyethoxy)ethylmethylaminomethane, (d) protecting tris-((methoxycarbonyl)ethoxy)methylaminomethane with a compound of formula ROCOCl to produce a compound formula 3, (e) adding NaOH to the compound of formula 3 to produce a compound of formula 4, (f) dissolving the compound of formula 4 and tris-((methoxycarbonyl)ethoxy)methylaminomethane and reacting with dicyclohexylcarbodiimide and hydroxybenzotriazole to produce a compound of formula 5, and (g) adding NaOH to the compound of formula 5 to produce the compound of formula 1. In the formula ROCOCl, 3, 4, and 5, R is a phenyl or a phenyl substituted with nitro, halogen, or cyano, naphthyl or anthryl.



copyright KIPO 2002

Legal Status

Date of request for an examination (20000905)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20030225)

Patent registration number (1003830800000)

Date of registration (20030423)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

BEST AVAILABLE COPY

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.
C07C 271/12

(11) 공개번호
(43) 공개일자

특2002-0019325
2002년03월12일

(21) 출원번호	10-2000-0052504
(22) 출원일자	2000년09월05일
(71) 출원인	학교법인 포항공과대학교, 정명식 대한민국 790-330 경북 포항시 남구 효자동 산31번지 포항종합제철 주식회사, 이구택 대한민국 790-300 경북 포항시 남구 괴동 1번지
(72) 발명자	박준원 대한민국 790-390 경상북도포항시남구지곡동교수아파트8동1301호 심지영 대한민국 630-042 경상남도마산시회원구회원2동644-30 문중호 대한민국 641-860 경상남도창원시동읍남산리143번지
(74) 대리인	송병옥
(77) 심사청구	있음
(54) 출원명	조절된 아민기 밀도와 공간을 제공하는 분자층을 표면에포함하는 기질 및 이의 제조방법

요약

본 발명은 바이오칩등의 기질로 사용될 수 있는, 저밀도 아민기를 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질에 관한 것이다.

본 발명은 이를 위하여, N-CBZ-[1]amine-[9]acid로 대표되는 카르복시산을 가지는 화학식 1의 화합물 및 이의 제조방법을 제공하며, 아미노 실란화된 기질표면의 아민기와 삼각뿔 형태의 화학식 1의 화합물을 반응시켜 제조되는 분자층을 표면에 포함하는 기질 및 이의 제조방법을 제공한다.

본 발명에 따르면 아미노실란화된 기질표면에서의 아민기 밀도를 대폭 감소시킬 수 있고, 낮은 아민기 밀도를 갖는 동시에 아민기간의 거리가 일정한 고체 기질은 DNA 칩이나 바이오칩을 개발하는데 중요한 기능을 수행할 수 있으며, 이밖에도 기질 표면에 원하는 분자들을 고정하고, 이들의 성질을 밝히는 표면연구에 사용할 수 있다.

대표도

도 1

색인어

아미노실란, 기질, 표면, 아민, 하이퍼브랜치 분자, 카르복시산, 바이오칩

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 화학식 1a의 화합물을 사용하여 조절된 아민기 밀도와 공간을 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질을 제조하는 과정을 나타낸 개략도이다.

도 2는 본 발명의 화학식 1a의 화합물을 사용하여 조절된 아민기 밀도와 공간을 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질을 제조하는 과정을 도 1에 연이어 나타낸 개략도이다.

도 3은 실시예 2에서 제조되는 조절된 아민기 밀도와 공간을 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질의 다양한 pH에 대한 안정도를 나타낸 그래프이다.

도 4는 실시예 2에서 제조되는 조절된 아민기 밀도와 공간을 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질의 열에 대한 안정도를 나타낸 그래프이다.

BEST AVAILABLE COPY

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 바이오칩등의 기질로 사용될 수 있는 저밀도 아민기를 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질에 관한 것으로, 특히 저밀도 아민기를 함유하는 분자층을 형성하기 위한 화합물 및 이의 제조방법과 이 화합물을 이용하여 제조되는 저밀도 아민기를 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

기질 표면의 실란화, 특히 아미노실란화는 효소, 항체와 같은 생체분자의 고정화, 무기 촉매의 고정화, 전극의 개질, 크로마토그래피 및 이온성 고분자, 비선형 광학적 발색단, 플러렌, 포르피린, 전이금속 착물 및 무기 콜로이드 입자를 함유하는 다양한 형태의 분자들의 자기조립용 발당 파운데이션 형성 등의 많은 분야에 적용되고 있다.

기질 표면에 형성된 아미노실란 분자층의 화학적 물리적 성질은 매우 중요한데, 이는 고정화되거나 자체 조립되는 분자의 형태 및 표면 밀도에 영향을 주며, 최종적으로 형성된 기능성 박막의 구조 및 성질을 결정하는 인자이기 때문이다.

한편, 현재까지 알려지 바에 의하면, 고체 지지체의 표면에 아민기를 형성할 때의 아민기의 개수는 100 \AA^2 당 1 내지 10 개다. 표면에 아민기를 갖는 고체 기질은 DNA 칩이나 바이오칩을 제조하는 기판으로 사용이 가능하다. 그러나 표면에 100 \AA^2 당 1 내지 10 개의 아민 밀도를 가지는 기질은 표면에 DNA 올리고뉴클레오타이드를 붙이거나 효과가 다른 바이오 분자들을 고정시킬 때 분자 간의 입체장애가 커서 제대로 고정되지 못한다. 또한 DNA 칩의 경우에는 표면에 고정된 단일가닥 DNA의 혼성화가 원활히 진행되어야 칩의 효율이 높아질 수 있으므로 표면에 고정시킨 단일가닥 DNA간의 거리가 상당한 간격을 유지해야 한다.

이를 위하여 타로브 등(Tarlov et al.)은 표면반응에 요구되는 자기조립분자의 농도를 낮추어 줌으로써 밀도를 조절한 연구결과를 보고하였다(J. Am. Chem. Soc. 120, 9787(1998)). 그러나 이러한 방법은 표면의 직접적인 개질이 아닌 농도에 의한 간접적 개질이며 작용기가 있는 분자끼리 응집되는 현상도 일어날 수 있어서 분포가 불균일하다. 즉, 단일가닥 DNA간의 거리를 균일하게 조절하기 어렵다는 단점이 있다. 그러므로 혼성화 효율과 농도의 최적조건을 찾는 것이 중요하다. 또한 일정 농도 이상의 단일가닥 DNA의 도입이 어려운 것이 단점으로 지적된다.

또 다른 예로, 오카하타 등(Okahata et al.)은 바이오틴(Biotin)과 아비딘(Avidin)의 결합을 이용하여 표면에 DNA를 도입하였다(J. Am. Chem. Soc. 120, 8537(1998)). 이들은 먼저 QCM(Quartz Crystal Microbalance) 표면에 금을 증착한 후, 티올과 아비딘을 작용기로 갖는 스페이서(spacer)를 합성하고 말단에 바이오틴을 가지는 단일가닥 DNA를 도입하였다. 이 방법에 있어서, 신호는 혼성화가 진행됨에 따라 변하는 QCM의 주파수이다. 그러나 이 방법도 표면의 직접적인 구조조절이 아니며 간접적인 바이오틴-아비딘의 결합을 이용한 것이며 QCM을 이용하기 때문에 여러 가지 제약이 따르는 것이 단점이다. DNA 뿐만 아니라 단백질의 경우에 있어서도 나선구조를 이루기 위해서는 여유 공간이 필요하다.

화이트셀 등(Whitesell et al.)은 아미노트리티올(aminotrithiol)을 금 표면에 단일층으로 쌓아서 폴리알라닌(polyalanine)이 나선구조를 이룰 수 있도록 하였다. 또한 폴리페닐-알라닌(polyphenyl-alanine)의 경우 단일층으로는 공간이 부족하여 나선구조를 이룰 수 없으므로 이중으로 층을 쌓아 여유 공간을 더 넓혀 나선구조를 이루도록 하였다(Science 261, 73(1993)). 표면을 직접 변형하여 단백질을 도입한 이 방법은 DNA의 경우에도 적용이 가능할 것으로 보이나, 단백질의 이중나선보다 DNA의 이중나선이 더 큰 직경(A 형은 25.5 \AA 이고, B 형은 23.7 \AA)을 가지므로 여기서 이용한 것보다도 더 큰 덴드리머를 표면에 도입하여야 한다. 또한 여기서 이용한 덴드리머는 황(sulfur)이 도입되어 있어서 금 표면에 서만 적용할 수 있는 한계가 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 고려하여, 저밀도의 아민기를 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질을 제조할 때 유용한 화합물 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

본 발명의 다른 목적은 아민기의 밀도가 낮으면서도 아민기 간의 거리가 일정한 분자층을 표면에 포함하는 기질 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 다중 이온결합을 통하여 보다 안정한 형태의 분자박막을 기질 표면에 형성하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 표면 상에 아민기의 밀도가 낮고 아민기 간의 거리가 일정한 분자층을 표면에 함유하고 있어서 기질 표면에 원하는 분자들을 고정하기가 용이한 기질 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

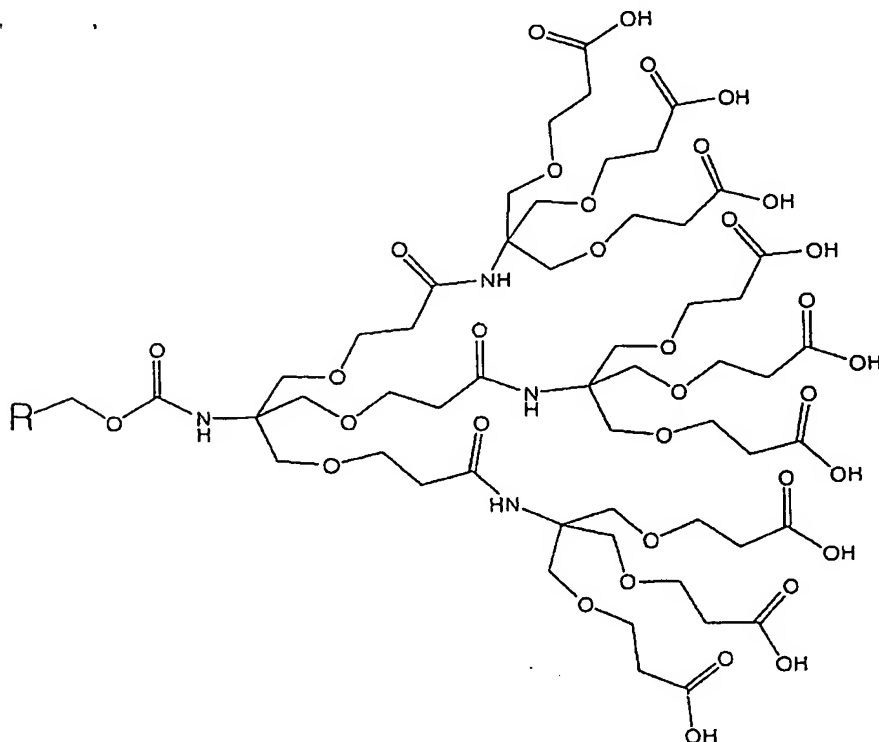
본 발명의 또 다른 목적은 DNA 칩이나 바이오칩을 개발하는데 유용하며, 기질 표면에 원하는 분자들을 고정하고 이들의 성질을 밝히는 표면연구에 사용할 수 있는 기질 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[화학식 1]

BEST AVAILABLE COPY



상기 식에서, R은 페닐(phenyl)이거나, 니트로(nitro)기, 할로겐(halogen), 또는 시아노(cyano)기로 치환된 페닐(phenyl), 나프틸(naphtyl), 또는 안트릴(anthryl)이다.

또한 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 카르복시산을 가지는 유도체의 제조방법에 있어서,

- a) 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄과 아크릴로니트릴을 시아노에탈레이션 반응시켜서 트리스[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄을 제조하는 단계;
- b) 상기 트리스[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄에 진한 염산용액을 가하고 환류시켜서 트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄을 제조하는 단계;
- c) 상기 트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄에 메탄올의 첨가로 에스테르화 반응시켜서 트리스[[(에톡시카르보닐)에톡시]메틸]아미노메탄을 제조하는 단계;

BEST AVAILABLE COPY

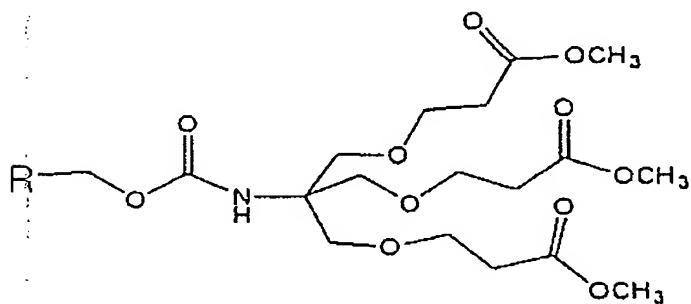
d) 상기 트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노에탄에 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 가하는 프로텍팅(보호) 반응에 의하여 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계

[화학식 2]



(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴)

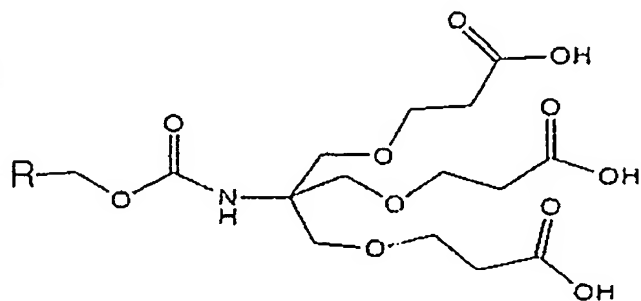
[화학식 3]



(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴);

e) 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물에 수산화나트륨 용액을 가하여 가수분해시켜서 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계

[화학식 4]

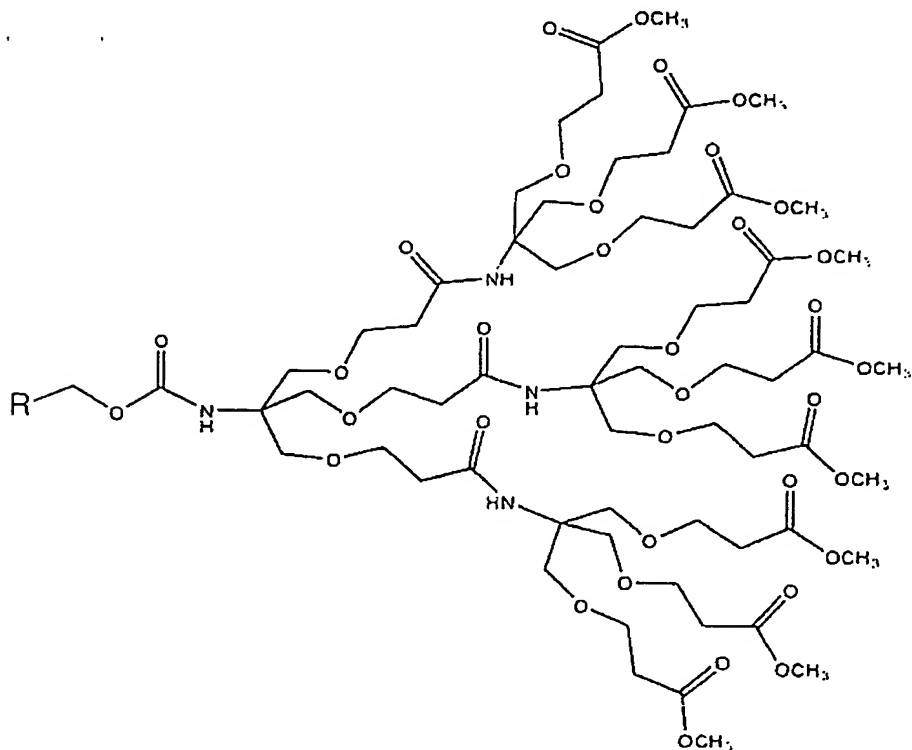


(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴);

f) 상기 화학식 4로 표시되는 화합물과 트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노에탄을 디메틸포름아마이드(DMF; dimethylformamide)에 녹이고, 디시클로헥실카르보디이미드(DCC; dicyclohexylcarbodiimide), 및 히드록시벤조트리아졸 (HOBT; hydroxybenzotriazole)를 첨가하고 반응시켜 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 제조하는 단계

[화학식 5]

BEST AVAILABLE COPY



(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴); 및

g) 상기 화학식 5로 표시되는 화합물에 수산화나트륨 용액을 가하여 가수분해시켜서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

또한 본 발명은 아미노실란화된 기질표면의 아민기와 삼각뿔 형태의 상기 화학식 1로 표시되는 카르복시산을 가지는 유도체 화합물을 반응시켜 제조되는 분자층을 표면에 포함하는 기질을 제공한다.

또한 본 발명은 조절된 아민기 밀도와 공간을 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질의 제조방법에 있어서,

a) 아미노실란의 분자층을 표면에 포함하는 기질을 제공하는 단계; 및

b) 상기 분자층에 함유된 아민기를 카르복시산을 가지는 유도체와 반응시키는 단계를 포함하는 기질의 제조방법을 제공한다.

BEST AVAILABLE COPY

또한 상기 b)단계의 유도체는 알단에 카르복시산 및 아민 작용기를 동시에 포함하는 것이 바람직하며, 상기 유도체가 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 더욱 바람직하다.

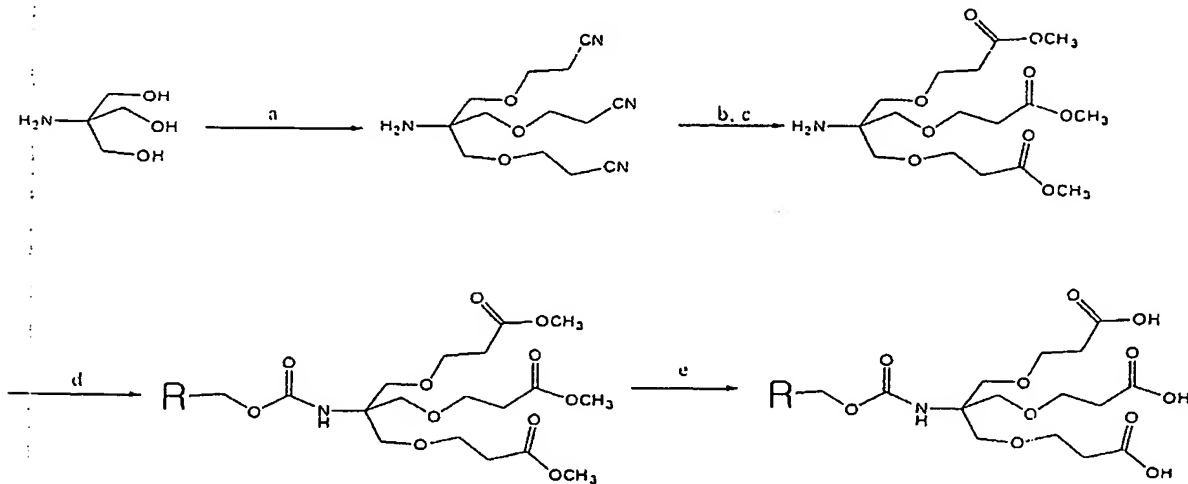
이하에서 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 아민 작용기 간의 거리가 상당히 임정한 분자층을 기질상에 형성되는 기질을 제공하기 위하여 아미노실란화된 기질 표면층의 아민기와 카르복시산을 가지는 유도체와 반응시켜서 기질을 제조한다. 특히 일정한 간격의 아민기를 가지는 분자층의 형성을 위하여 분자량이 일정한 상기 화학식 1의 고분자 유도체를 합성하여 사용하는데, 이 고분자는 하나의 아민기와 9 개의 카르복시산 작용기를 가지는 삼각뿔 형태의 하이퍼브랜치 분자이다. 다시 말하면 본 발명은 아미노실란화된 기질 표면의 아민기와 삼각뿔 형태를 가지는 고분자인 화학식 1의 화합물을 반응시켜 기질 표면 상에 아민기의 밀도가 낮고 그 거리가 일정한 분자층을 형성할 수 있도록 한 것이다.

이를 위하여 본 발명은 상기 화학식 1로 나타내는 화합물을 제조한다. 합성되는 상기 화학식 1의 화합물의 R은 페닐(phenyl)이거나, 니트로기(nitro), 할로겐(halogen), 또는 시아노기(cyano)로 치환된 페닐(phenyl), 나프틸(naphthyl), 또는 안트릴(anthryl)이다. 즉, R은 벤젠고리의 페닐이거나, 벤젠고리의 수소가 각각, 또는 동시에 전자를 끄는 작용기로 치환된 2-니트로벤질(2-nitrobenzyl), 3-니트로벤질(3-nitrobenzyl), 4-니트로벤질(4-nitrobenzyl), 2-플루오로벤질(2-fluorobenzyl), 3-플루오로벤질(3-fluorobenzyl), 4-플루오로벤질(4-fluorobenzyl), 2-클로로벤질(2-chlorobenzyl), 3-클로로벤질(3-chlorobenzyl), 4-클로로벤질(4-chlorobenzyl), 2-브로모벤질(2-bromobenzyl), 3-브로모벤질(3-bromobenzyl), 4-브로모벤질(4-bromobenzyl), 2-요오도벤질(2-iodobenzyl), 3-요오도벤질(3-iodobenzyl), 4-요오도벤질(4-iodobenzyl), 2-시아노벤질(2-cyanobenzyl), 3-시아노벤질(3-cyanobenzyl), 4-시아노벤질(4-cyanobenzyl) 등이 될 수 있으며, 벤젠고리가 변형된 1-나프틸(1-naphthyl), 2-나프틸(2-naphthyl), 또는 9-안트릴(9-anthryl) 등이 될 수 있다.

하기 반응식 1 및 반응식 2는 상기 화학식 1의 화합물을 합성하는 방법을 나타내는 반응식이다.

[반응식 1]



상기 반응식 1에서,

a는 $\text{CH}_2=\text{CHCN}$, KOH, p-디옥산(p-dioxane)을 가하여 25 °C에서 48 시간 동안 반응시키는 것이고,

b는 진한 염산을 가하여 3 시간 동안 환류(reflux)시키는 것이고,

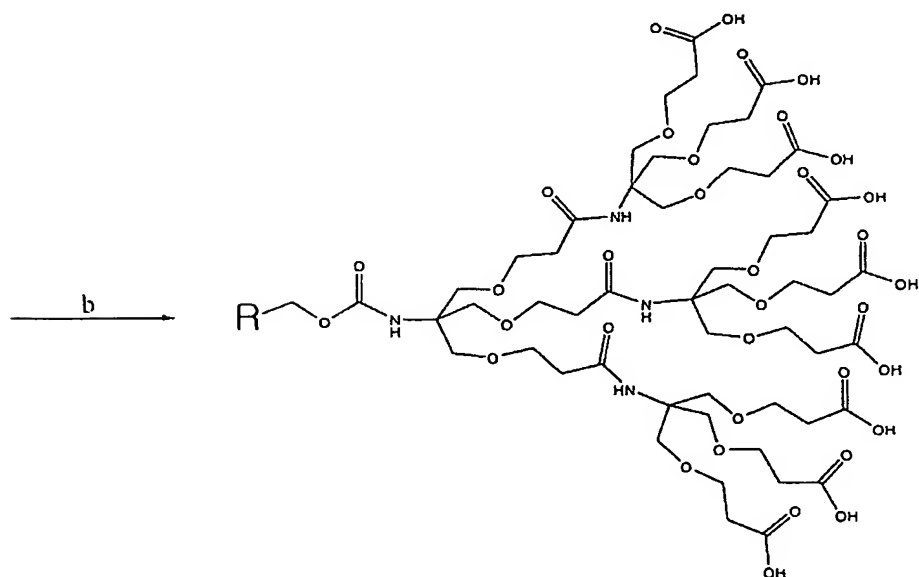
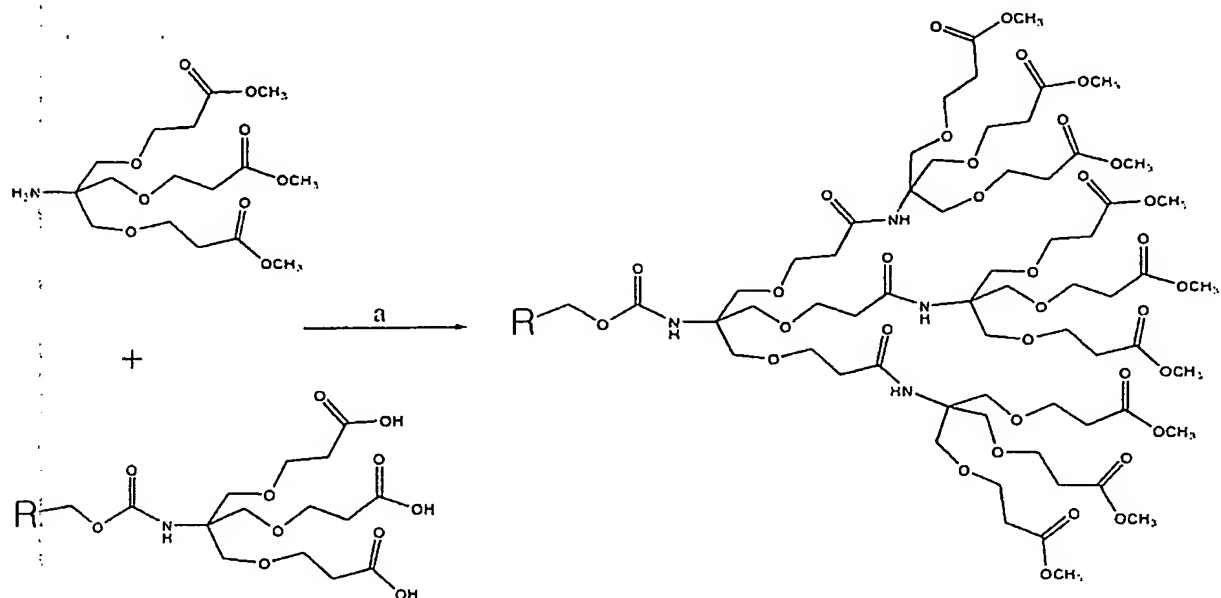
c는 MeOH를 가하고 25 °C에서 24 시간 동안 교반 반응시키는 것이고,

d는 화학식 2의 화합물, NaHCO_3 , H_2O 를 가하고 25 °C에서 12 시간 동안 반응시키는 것이고,

e는 1 N NaOH를 가하고 25 °C에서 12 시간 동안 반응시키는 것이다.

[반응식 2]

BEST AVAILABLE COPY



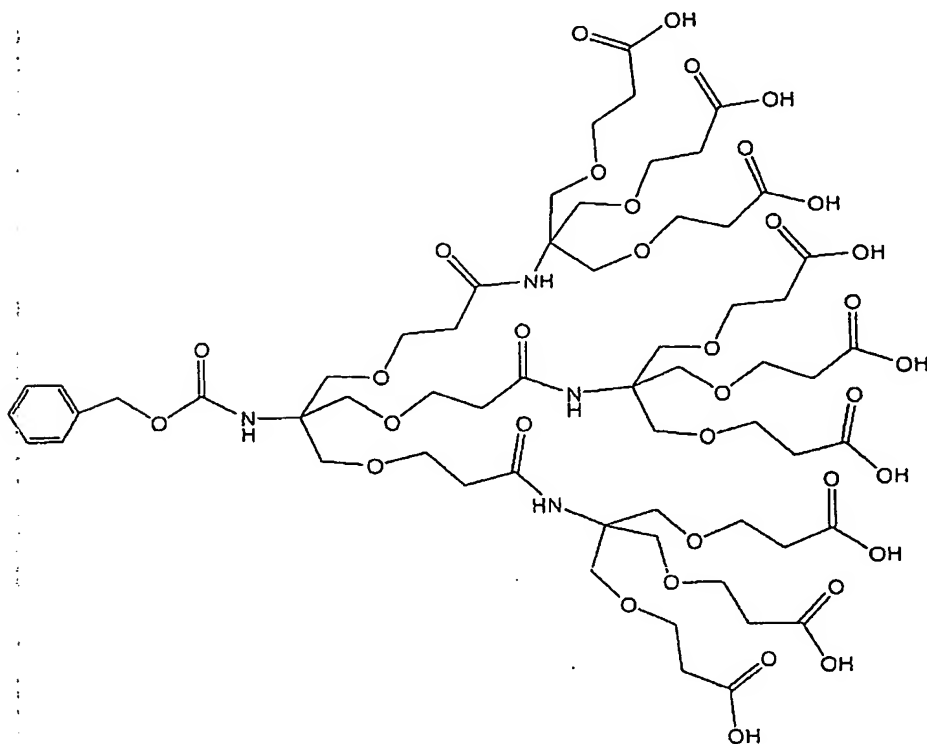
상기 반응식 2에서, a는 DCC, 1-히드록시벤조트리아졸, 및 DMF를 가하고 25 ℃에서 48 시간 동안 반응시키는 것이고,

b는 1 N NaOH를 가하고 25 ℃에서 12 시간 동안 반응시키는 것이다.

BEST AVAILABLE COPY

상기 화학식 1의 화합물 중에서 대표적인 화학식 1의 R이 페닐인 하기 화학식 1a로 표시되는 N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[[(N'-(카르보닐)-트리스((카르복시에톡시)메틸)메탄아미노)에톡시)메틸]아미노메탄(이하 N-CBZ-[1]amine-[9]acid)이다.

[화학식 1a]



이하에서는 상기 화학식 1a로 표시되는 N-CBZ-[1]amine-[9]acid 화합물을 중심으로 설명한다. 화학식 1의 화합물의 나머지 화합물은 화학식 1a로 표시되는 N-CBZ-[1]amine-[9]acid 화합물과 원료 선택에서만 차이를 가지고 동일한 방법으로 제조될 수 있으며, 그 특성도 기질 표면 상에서 동일한 양상을 나타낸다.

본 발명은 기질 표면에 형성되는 아미노실란 분자층의 아민기를 N-CBZ-[1]amine-[9]acid와 같은 구조를 갖는 화학식 1로 표시되는 화합물과 반응시켜 기질 표면의 아민기 밀도를 적절하게 감소시킬 수 있다. 그 중에서 이러한 N-CBZ-[1]amine-[9]acid는 말단의 아민 작용기가 CBZ(carbobenzyloxy)로 보호되어 있다.

상기 아민작용기가 보호된 N-CBZ-[1]amine-[9]acid는 표면 반응 도중에 아민 작용기가 다른 분자들로부터 손상되지 않으며, 또한 합성과정 중 발생하는 부반응을 최소화하기 위한 형태로 고안되었다. CBZ는 탈보호가 용이하여 반응 후, 다시 일차 아민 작용기로 되돌릴 수 있다.

상기 화학식 1a의 N-CBZ-[1]amine-[9]acid를 합성하는데 있어서 가장 중요한 부분인 반복단위(repeating unit)는 상업적으로 많이 이용되며 비교적 가격이 저렴한 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(tris(hydroxymethyl)aminomethane)을 기본으로 하여 합성한다. 언급하지 않은 화학식 1의 나머지 화합물을 제조할 때도 동일하다.

먼저 브루손(Bruson)의 방법을 이용하여 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄과 아크릴로니트릴(acrylonitrile)을 시아노에틸레이션(cyanoethylation) 반응시켜서 트리스[[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄(tris[[(cyanoethoxy)methyl]aminomethane)]을 합성한다. 합성에 사용되는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 및 수산화칼륨(KOH)은 흡습성이 강하여 진공 하에서 충분히 건조시켜 반응에 사용해야 하며, 수산화칼륨의 양이 반응에서 중요한 부분이다. 수산화칼륨은 반응에 사용한 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄의 5 내지 20 중량%까지 다양하게 사용하였으며, 그 중 15 중량%가 가장 적절하다. 수산화칼륨의 양이 너무 많으면 아크릴로니트릴의 고분자화가 증가되고, 양이 적으면 시아노에틸레이션 반응이 진행되지 않는다. 반응이 완료된 후 ^{13}C NMR의 118.5 ppm에서 확인한 결과 니트릴의 특징적인 피크가 나타나며, 이는 뉴컴(Newcome) 등이 합성한 화합물의 스펙트럼과 일치하였다.

합성된 트리스[[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄은 유기용매에 잘 녹으므로 컬럼크로마토그래피로 분리해도 되지만 다른 분리 과정없이 진한 염산용액에서 3 시간 정도 환류시켜주면 트리스[[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄(tris[[(carboxy ethoxy)methyl]aminomethane)]이 얻어진다. 니트릴 작용기가 카르복시산으로 바뀌면서 부산물로 염화암모늄(NH_4Cl)이 염의 형태로 다량 얻어진다. 아세톤에 녹여 염화암모늄 염을 걸러낸 후 감압증류한 후 ^{13}C NMR의 118.5 ppm에서 확인한 결과 니트릴의 특징적인 피크가 사라지고 대신에 카르복시산의 176.2 ppm의 피크가 얻어진다. 상기 화합물 트리스[[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄을 보호하기 위하여 여러 가지 보호시약(protecting reagent)을 사용하여 보았으나 말단의 카르복시산이 아민 작용기와 수소결합하고 있어서 반응이 진행되지 못하였다. 그러므로 말단의 카르복시산 역시 보호하는 과정이 요구된다.

합성된 트리스[[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄은 산성을 띄는 오일형태의 화합물이며, 메탄올(methanol)을 첨가하면 에스테르화 반응이 진행된다. 이 방법을 통하여 아주 간단히 트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄(tris[[(methoxycarbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane)]이 합성되어 말단의 카르복시산이 보호된다. 뉴컴 등은 이런 번거로움을 없애기 위하여 트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄을 메탄올에 넣고 염산가스를 주입하는 방법을 이용하였지만 수율이 낮으며, 염산가스를 사용하므로 주의를 요하는 반응이다. 이에 반하여 에스테르화 반응을 이용한 본 발명의 방법은 가스를 사용하지 않고 염산 용액을 이용하므로 뉴컴 등의 방법보다 훨씬 간단하고 안전하며, 수율도 훨씬 높다. 트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄은 ^{13}C NMR에서 에스테르와 메톡시기에 기인한 각각 176.2 ppm, 51.6 ppm의 피크가 확인된다.

BEST AVAILABLE COPY

덴드리머 제조를 위한 반복 단위는 트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄이 이용되며, 코아 단위는 트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄을 보호하여 사용한다. 아민을 보호하기 위하여 디-터셔리-부틸 디카보네이트 (di-tert-butyl dicarbonate)와 벤질클로로포메이트(benzyl chloroformate)를 사용하였다. 두 가지 시약 모두 보호과정은 쉽게 진행되었다. 하지만 디-터셔리-부틸 디카보네이트를 이용한 BOC(t-butoxycarbonyl) 기의 경우 에스테르를 카르복시산으로 바꾸는 과정에서 문제가 발생할 수 있다.

반응이 완결된 후 합성된 N-(BOC)-트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄 (N-(butoxycarbonyl)-tris[(carboxyethoxy)methyl]aminomethane)을 분리하는 과정에서 사용하는 묽은 염산용액에서 BOC 기가 깨져서 다시 트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄의 형태로 되돌아가 버리게 된다. 가수분해를 방지하기 위하여 염산을 사용하지 않고 수용액 상태에서 그대로 DCC(Dicyclohexylcarbodiimide)를 이용하여 커플링(coupling)시켜 보았으나 반응이 전혀 진행되지 않았으므로 BOC에 관련한 문제점을 해결할 수 없었다. 수율이 낮은 이유로는 DCC 등을 이용하는 펩타이드(peptide) 결합 형성이 수용액에서는 전형적으로 아주 낮은 수율을 반응이기 때문이라고 생각된다.

벤질클로로포메이트를 이용하는 CBZ는 워크업(workup)할 때 사용되는 염산에 대하여 아주 안정하여 반응이 끝난 후 N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄(N-(benzyloxycarbonyl)-tris[(carboxyethoxy)methyl]amino methane)을 유기층으로 뽑아내기가 수월하다. N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄은 ^{13}C NMR에서 CBZ에 기인한 128.7 ppm, 128.2 ppm, 및 카바메이트(carbamate)에 기인한 155.2 ppm 등의 피크를 보여 주었다.

N-CBZ-[1]amine-[9]acid의 합성에서 가장 낮은 수율(33.3 %)을 보이는 커플링(coupling)은 4.5 당량의 트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄과 N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄을 DMF(N,N-dimethylformamide)에 녹인 후, 각각 3 당량의 DCC, HOBT 등을 첨가하여 48 시간 정도 교반시키면 된다. 반응이 진행되면 DMF에 녹지 않는 디시클로헥실우레아 (dicyclohexylurea)가 발생한다.

이렇게 합성된 N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(((N'-(카르보닐)-트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]메틸아미노)에톡시)메틸]아미노메탄(N-(benzyloxycarbonyl)-tris[(((N'-(carbonyl)-tris[(((methoxycarbonyl)ethoxy)methyl)methylamino)ethoxy)methyl]aminomethane)은 ^{13}C NMR에서 에스테르와 아미드에 기인한 172.3 ppm, 171.3 ppm의 특징적인 피크를 관찰할 수 있다. 또한 이들의 크기비가 1:3 정도로 나타났다. 그리고 질량분석스펙트럼(FAB) 결과는 분자량이 1556($M^+ + 1$)인 곳에서 N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(((N'-(카르보닐)-트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]메틸아미노)에톡시)메틸]아미노메탄이 합성된 증거가 되었다.

N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(((N'-(카르보닐)-트리스[(((메톡시카르보닐)에톡시)메틸]메틸아미노)에톡시)메틸]아미노메탄을 1 N NaOH 용액에서 가수분해하면 알단이 카르복시산으로 되는 N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(((N'-(카르보닐)-트리스[(((카르복시에톡시)메틸]메틸아미노)에톡시)메틸]아미노메탄(N-(benzyloxycarbonyl)-tris[(((N'-(carbonyl)-tris[(((carboxyethoxy)methyl)methylamino)ethoxy)methyl]aminomethane)을 얻을 수 있다. N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(((N'-(카르보닐)-트리스[(((카르복시에톡시)메틸]메틸아미노)에톡시)메틸]아미노메탄의 질량분석 스펙트럼 결과 1429(M^+)인 곳에서 피크가 관찰됨으로써 반응이 진행되었음을 알 수 있었다. 이외에도 상기 화합물들의 적외선 분광법과 원소분석에 의한 결과를 표 1 내지 표 6에 나타내었다.

[표 1]

tris[(cyanoethoxy)methyl]aminomethane	^1H NMR(CDCl_3) 63.68(t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$, 6), 3.42(s, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 6H), 2.63(t, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 6H), 1.83(s, H_2N , 2H). ^{13}C NMR(CDCl_3) 6118.5($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$), 72.7($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 66.1($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 56.4($\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2-)_3$), 19.1($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$).
---------------------------------------	--

[표 2]

tris[(((methoxycarbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane	^1H NMR(CDCl_3) 63.72-3.68(m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, 15H), 3.34(s, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 6H), 2.58(t, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 6H), 1.83(s, H_2N , 2H). ^{13}C NMR(CDCl_3) 6172.1($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 72.6($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 66.8($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 56.0($\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2-)_3$), 51.6($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 34.8($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$). IR(CHCl_3) 3376, 2953, 2871, 1740, 1587, 1438, 1361, 1265, 1197, 1112, 1074, 1023 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_9$ C, 50.65; H, 7.70; N, 3.69. Found: C, 50.63; H, 7.81; N, 3.97.
--	---

[표 3]

BEST AVAILABLE COPY

N-(benzyloxy carbonyl)-tris[(((methoxycarbonyl)ethoxy)methyl)]aminomethane	¹ H NMR(CDCl ₃) δ7.33(m, C ₆ H ₅ CH ₂ , 5H), 5.28(s, OCONH, 1H), 5.03(s, C ₆ H ₅ CH ₂ O, 2H), 3.69-3.64(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ COOCH ₃ , 21H), 2.52(t, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 6H). ¹³ C NMR(CDCl ₃) δ172.1(CH ₂ COOCH ₃), 155.3(OCONH), 137.1(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.7(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.2(C ₆ H ₅ CH ₂), 69.6(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 67.0(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 66.3(C ₆ H ₅ CH ₂), 59.0(OCONHC(CH ₂ -) ₃), 51.6(CH ₂ COOCH ₃), 34.8(CH ₂ COOCH ₃). IR(CHCl ₃) 3379, 3027, 2952, 2879, 1738, 1509, 1438, 1363, 1235, 1199, 1112, 1072, 1027 cm ⁻¹ . Anal. Calcd for C ₂₄ H ₃₅ NO ₁₁ C, 56.13; H, 6.87; N, 2.73. Found: C, 56.23; H, 6.90; N, 2.88.
--	--

[4]

N-(benzyloxy carbonyl)-tris[(carbonylethoxy)methyl]aminomethane	¹ H NMR(CDCl ₃) δ10.00(br, CH ₂ COOH, 3H), 7.32(m, C ₆ H ₅ CH ₂ , 5H), 5.28(s, OCONH, 1H), 5.03(s, C ₆ H ₅ CH ₂ O, 2H), 3.66(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ COOH, 12H), 2.52(t, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 6H). ¹³ C NMR(CDCl ₃) δ177.5(CH ₂ COOH), 155.2(OCONH), 137.1(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.7(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.2(C ₆ H ₅ CH ₂), 69.8(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 66.8(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 60.9(C ₆ H ₅ CH ₂), 59.1(OCONHC(CH ₂ -) ₃), 35.0(CH ₂ COOH). IR(CHCl ₃) 3600-2300, 3340, 3026, 2927, 2882, 1714, 1517, 1455, 1417, 1241, 1193, 1110, 1071 cm ⁻¹ . Anal. Calcd for C ₂₁ H ₂₉ NO ₁₁ C, 53.50; H, 6.20; N, 2.97. Found: C, 53.49; H, 6.52; N, 2.64.
---	---

[5]

N-(benzyloxycarbonyl)-tris[(N'-(carbonyl)-tris-(((methoxycarbonyl)ethoxy)methyl)methylamino)ethoxy)methyl]aminomethane	¹ H NMR(CDCl ₃) δ7.32(m, C ₆ H ₅ CH ₂ , 5H), 6.18(s, CH ₂ CONH, 3H), 5.64(s, OCONH, 1H), 5.03(s, C ₆ H ₅ CH ₂ O, 2H), 3.68-3.65(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ COOCH ₃ , CH ₂ OCH ₂ CH ₂ CONH, 75H), 2.52(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 24H). ¹³ C NMR(CDCl ₃) δ172.3(CH ₂ COOCH ₃), 171.3(CH ₂ CONH), 155.2(OCONH), 137.1(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.7(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.2(C ₆ H ₅ CH ₂), 69.6(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 67.8(C ₆ H ₅ CH ₂), 67.0(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 60.0(CH ₂ CONHC(CH ₂ -) ₃), 59.2(OCONHC(CH ₂ -) ₃), 51.9(CH ₂ COOCH ₃), 37.6(CH ₂ CONH), 35.0(CH ₂ COOCH ₃). MS(FAB ⁺ , m/z) 1556.2(M+1). IR(CHCl ₃) 3369, 3067, 2953, 2877, 1736, 1668, 1528, 1438, 1368, 1328, 1265, 1199, 1109, 1026 cm ⁻¹ . Anal. Calcd for C ₆₉ H ₁₁₀ NO ₃₅ C, 53.27; H, 7.13; N, 3.60. Found: C, 53.03; H, 7.27; N, 3.78.
--	--

[6]

BEST AVAILABLE COPY

N-(benzyloxycarbonyl)-tris[(N'-(carboxyl)-tris-(carboxyethoxy)-methyl)methylamino]-ethoxy)methyl]aminomethane	¹ H NMR(DMSO) δ 12-10(br, CH ₂ COOH, 9H), 7.37(m, C ₆ H ₅ CH ₂ , 5H), 7.09(s, CH ₂ CONH, 3H), 6.27(s, OCONH, 1H), 5.02(s, C ₆ H ₅ CH ₂ O, 2H), 3.71-3.60(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ COOH, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ CONH, 48H), 2.45(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 24H). ¹³ C NMR(DMSO) δ 173.2(CH ₂ COOH), 171.0(CH ₂ CONH), 155.2(OCONH), 137.1(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.7(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.1(C ₆ H ₅ CH ₂), 68.7(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 67.9(C ₆ H ₅ CH ₂), 67.2(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 60.3(CH ₂ CONHC(CH ₂) ₃), 60.2(OCONHC(CH ₂) ₃), 37.6(CH ₂ CONH), 35.0(CH ₂ COOCH ₃). MS(FAB ⁺ , m/z) 1429.6(M ⁺). IR(neat) 3600-2300, 3342, 3026, 2924, 2880, 1715, 1651, 1528, 1455, 1417, 1196, 1109 cm ⁻¹ . Anal. Calcd for C ₆₀ H ₉₂ NO ₃₅ C, 49.18; H, 6.60; N, 3.82. Found: C, 49.32; H, 6.84; N, 3.64.
---	--

이하에서는 기질 표면에 조절된 아민기 밀도를 갖는 분자층을 형성하는 방법에 대하여 설명한다.

먼저, 기질 표면을 깨끗하게 세정한 다음, 이를 건조한다. 이후, 건조된 기질을 아미노실란 화합물과 용매로 된 용액에 소정의 시간 동안 담구어 아미노실란화를 시킨다. 여기에서 아미노실란 화합물로는 산성의 부산물을 형성하지 않는 물질로, 3-아미노프로필트리에톡시실란, 3-아미노프로필디에톡시메틸실란, 3-아미노프로필에톡시디메틸실란 등이 있다. 또한 아미노실란 화합물을 용해시키기 위한 용매로 톨루엔을 사용한다. 그리고 상기 바탕으로 사용되는 기질은 특별히 한정되지 않으며, 실리콘 웨이퍼, 유리, 실리카, 용융실리카(fused silica) 등이 사용될 수 있다.

아미노실란화 반응이 완결되면, 기질을 용매로 세척한 다음, 이를 건조한다. 그 후, 표면에 아미노실란화된 기질을 N-CBZ-[1]amine-[9]acid를 포함한 용매에 담그고 불활성 가스 분위기를 유지한다. 반응시간은 12 시간 정도가 적당하며, 실온에서 반응시킨다.

한편 N-CBZ-[1]amine-[9]acid는 알단의 아민 작용기가 보호되어 있으므로 아민기를 기질 표면에 드러나게 하려면 보호기를 제거하는 과정이 필요하다. 보호기의 제거는 기질을 니트(neat) 트리플루오로아세트산에 담근 다음, 실온에서 초음파 처리하는 과정이 수반된다. 이 후 탈보호 과정이 완결되면 기질 표면을 다량의 용매, 예를 들어 메탄올로 세척하여 기질 표면에 물리적으로 흡착된 트리플루오로아세트산 및 떨어진 보호기를 제거한다.

상기 과정에 의하여 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같은 분자층을 갖는 기질을 얻을 수 있게 된다.

도 1을 살펴보면, N-CBZ-[1]amine-[9]acid는 알단의 카복시산이 아미노실란화된 기질 표면의 아민과 이온결합으로 강하게 결합하여 아미노실란화된 기질 표면에 강하게 흡착되어 있다. 이 결합의 안정성은 도 3에 나타내었다. 광범위한 pH에서 안정성을 보이며, 특히 중성의 pH에서 상당히 안정하여 분자박막의 유용성이 많다. 그리고 도 2를 살펴보면 기질 최상부 표면상의 보호된 아민 작용기들은 모두 일차아민으로 변형되어 큰 반응성을 나타낼 수 있게 된다.

본 발명에 따라 얻어지는 표면에 적절한 아민기 밀도를 갖는 고체기질은 아민 작용기의 밀도가 0.05 내지 0.3 amines/nm²를 나타내고, 각각의 아민기는 매우 균일하게 분포되어 있어서, 이를 이용하여 DNA 칩이나 바이오칩을 제조하기에 유리하다.

이에 따라서 본 발명의 고체기질은 DNA 칩이나 바이오칩을 개발하는데 중요한 기능을 수행할 수 있다. 예를 들면 DNA 칩은 올리고뉴클레오타이드를 고체기질 상부에 고정시키고자 할 때 기질 표면에 조절된 개 수의 아민기를 가질수록 도입되는 생분자들 간의 입체장애가 적어서 원활하게 도입되어 강하게 결합될 수 있다. 이는 칩의 안정도를 높일 수 있게 되고, 칩을 제조하는 과정을 보다 용이하게 제공한다.

또한 바이오칩의 경우와 같이 효소나 다른 바이오 분자들을 고정시키고자 할 때에도 기질 표면의 작용기 밀도가 조절될수록 기질 표면에 원활하게 고정될 수 있게 되어 칩의 생산 효율을 향상시킬 수 있다. 이밖에도 기질 표면에 원하는 분자들을 고정하고, 이들의 성질을 밝히는 표면연구에 중요한 표면기질로 사용이 가능하다. 또한 이러한 방법에 의하여 제공되는 충분한 공간은 각각의 생분자가 효율적인 센서로 작용하는데 크게 기여할 수 있다.

이하의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이지 이들만으로 한정하는 것이 아니다.

실시예 1

가) 트리스[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄(Tris[(cyanoethoxy)methyl]amino methane)의 합성

둥근 바닥 플라스크(2 l)에 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(tris(hydroxymethyl)aminomethane)(20.2 g, 167 mmol)과 촉매량의 수산화칼륨(3.0 g, 53 mmol)을 넣고 12 시간 정도 진공 하에서 건조시킨다. 파라-디옥산(p-dioxane) 용매를 500 ml 넣은 후 시료가 녹을 때까지 교반시킨다. 3.5 당량의 아크릴로니트릴(acrylonitrile)(38.5 ml, 585 mmol)을 주사기 펌프(syringe pump)로 천천히 주입한다. 반응의 진행 정도는 얇은 막 크로마토그래피를 통해 확인하며 반응이 완결되면 물과 클로르포름으로 추출한다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조하고 여과한 뒤 유기용매를 증발시킨다. 전개용매(ethyl acetate : methanol = 4 : 1 (v/v), R_f : 0.64)를 이용해 칼럼 크로마토그래피하면 점도가 있는 노란색 액체가 얻어진다. 여러 번에 걸쳐 분리하였을 때 얻어진 총량은 34.8 g이다(34.8 g, 수율 74.3 %).

나) 트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시]메틸]아미노메탄(Tris[[(methoxy-carbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane)의 합성

트리스[[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄(Tris[(cyanoethoxy)methyl]amino methane)(2.0 g, 7.1 mmol)을 둥근 바닥 플라스크(500 mL)에 넣고 과량의 진한 염산을 20 mL 정도 첨가해 3 시간 동안 환류시킨다. 진공 하에서 용매를 제거하면 하얀색 침전과 함께 짙은 갈색의 끈적한 액체가 형성된다. 이것을 아세톤에 녹여 여과한다. 하얀색 침전은 염화암모늄염이며 여과된 액체는 회전 증류기(rotary evaporator)를 이용해 감압 증류하여 용매를 제거한다. 갈색의 끈적한 액체를 물과 클로르포름으로 추출하여 물층을 취한다. 물층을 감압 증류한 뒤 메탄올에 녹여 에스테르 화시킨다. 24 시간 정도 메탄올에서 교반한 뒤 트리에틸아민(triethylamine)을 과량 첨가하여 알칼리용액으로 만들어준다. 용액을 감압 증류한 뒤 물을 넣고 클로르포름으로 추출하여 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조하고 여과한다. 용매를 제거한 뒤 순수한 화합물을 얻기 위하여 전개용매(ethyl acetate : methanol = 8 : 1 (v/v), R_f : 0.25)를 이용해 칼럼 크로마토그래피하면 점도가 있는 노란색 액체가 얻어진다(2.33 g, 수율 80.6 %).

다) N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시]메틸]아미노메탄(N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[[(methoxycarbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane)의 합성

트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시]메틸]아미노메탄(Tris[[(methoxycarbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane)(1.0 g, 2.5 mmol)을 10 mL의 물에 녹인 뒤 0 °C로 냉각하면서 중탄산나트륨(NaHCO_3)을 0.3 g 첨가하여 교반시킨다. 1 시간 정도 지나 용액이 더욱 알칼리화되면 벤질 클로르포메이트(benzyl chloroformate)(0.50 mL, 3.5 mmol)를 천천히 과량 첨가한다. 반응이 끝나면 물에 녹지 않는 기름이 가라앉아 있는 것처럼 보이며 이것을 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 추출한다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조하고 여과한다. 용매를 감압 증류로 제거한 뒤 전개용매(ethyl acetate : hexane = 1 : 1 (v/v), R_f : 0.46)를 이용해 칼럼 크로마토그래피하면 점도가 있는 노란색 액체가 얻어진다(1.01 g, 수율 77.3 %).

라) N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(카복시에톡시)메틸]아미노메탄(N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[(carboxyethoxy)methyl]aminomethane)의 합성

N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시]메틸]아미노메탄(N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[[(methoxycarbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane)(2.0 g, 3.7 mmol)을 5 mL 메탄올에 녹인 후 과량의 1.0 N 수산화나트륨(15 mL, 150 mmol)을 가해 교반시킨다. 수산화나트륨을 가하면 처음엔 뿌옇게 흐려졌다가 차츰 맑은 용액상태가 된다. 교반한지 12 시간 정도가 지나면 용매를 감압 증류로 제거한 뒤 물과 클로르포름을 넣고 추출한다. 유기층은 버리고 물층만 취하여 0 °C에서 묽은 염산용액으로 산성화시킨다($\text{pH} \approx 1 \sim 2$). pH 용지로 산도를 확인한 뒤 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 추출한다. 추출한 용액을 감압 증류한 뒤 전개용매(ethyl acetate : methanol = 2 : 1 (v/v), R_f : 0.72)를 이용해 칼럼 크로마토그래피하면 점도가 있는 노란색 액체가 얻어진다(1.52 g, 수율 82.4 %).

마) N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[[(N'-(카르보닐)-트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시]메틸]메틸아미노)에톡시]메틸]아미노메탄(N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[[(N'-(carbonyl)-tris[[(methoxycarbonyl)-ethoxy)methyl]methylamino)ethoxy)methyl]aminomethane)의 합성

N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[(카복시에톡시)메틸]아미노메탄(N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[(carboxyethoxy)methyl]aminomethane)(1.37 g, 2.9 mmol)에 디시클로헥실카르보디이미드(dicyclohexylcarbodiimide; DCC; 1.77 g, 8.66 mmol), 1-히드록시벤조트리아졸(1-hydroxybenzotriazole; HOBt; 1.17 g, 8.66 mmol)을 각각 3 당량씩 넣고 25 mL 디메틸포름아미드(DMF) 용매에서 교반시킨다. 이 용액에 트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시]메틸]아미노메탄(tris[[(methoxy-carbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane)(5.00 g, 13.2 mmol)을 4.5 당량 넣고 48 시간 동안 반응시킨다. 반응이 진행되면 용매에 녹지 않는 디시클로헥실우레아(dicyclohexylurea)가 발생해 고체상태로 떠난다. 반응이 끝나면 용매를 감압 증류 및 진공 하에서 제거하고 남은 것을 이염화메탄(dichloromethane)에 녹인 뒤 여과한다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조하고 여과한다. 용매를 감압 증류로 제거한 뒤 전개용매(ethyl acetate : methanol = 4 : 1 (v/v), R_f : 0.82)를 이용해 칼럼 크로마토그래피하면 점도가 아주 강한 노란색 액체가 얻어진다(1.50 g, 33.3 %).

바) N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[[(N'-(카르보닐)-트리스[(카복시에톡시)메틸]메틸아미노)에톡시]메틸]아미노메탄(N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[[(N'-(carbonyl)-tris[(carboxyethoxy)-methyl]methylamino)ethoxy)methyl]aminomethane)의 합성

N-(벤질옥시카르보닐)-트리스[[(N'-(카르보닐)-트리스[(메톡시카르보닐)에톡시]메틸]메틸아미노)에톡시]메틸]아미노메탄(N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[[(N'-(carbonyl)-tris[[(methoxycarbonyl)-ethoxy)methyl]methylamino)ethoxy)methyl]aminomethane)(2.00 g, 1.28 mmol)을 5 mL 메탄올에 녹인 후 과량의 1.0 N 수산화나트륨(15 mL, 150 mmol)을 가해 교반시킨다. 수산화나트륨을 가하면 처음엔 뿌옇게 흐려졌다가 차츰 맑은 용액상태가 된다. 교반한지 24 시간 지나면 용매를 감압 증류한 뒤 물과 클로르포름으로 추출한다. 유기층은 버리고 물층만 취하여 0 °C에서 묽은 염산용액으로 산성화시킨다($\text{pH} \approx 1 \sim 2$). pH 용지로 산도를 확인한 뒤 염화나트륨(2.0 g)을 넣고 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 추출한다. 추출한 용액을 감압하에 용매를 날리면 점도가 있는 노란색 액체가 얻어진다(1.34 g, 수율 73.3 %).

실시예 2

깨끗하게 세정된 실리카 기질을 20 mTorr의 진공에서 건조하였다.

질소 분위기 하에 둥근바닥 플라스크에 (3-아미노프로필)디에톡시메틸실란의 톨루엔 용액(10^{-3} M)을 넣은 다음, 상기 건조된 실리카 기질을 침지시키고 상온에서 반응시켰다.

상기 실란화 반응이 완결되면, 기질을 톨루엔으로 세척하여 약 120 °C의 오븐에서 30 분 동안 건조하였다. 기질들을 상온으로 냉각시킨 후, 톨루엔, 톨루엔 및 메탄올의 혼합용액(1:1 부피비) 및 메탄올에 순차적으로 담그어 3 분 동안 초음파 세척을 하였다. 이 기질들을 약 20 mTorr의 진공에서 건조한 후, 표면이 아미노실란화된 기질을 상기 실시예 1에서 제조된 N-CBZ-[1]amine-[9]acid를 포함하는 용매에 담그고 불활성 가스 분위기를 유지한다. 이를 실온에서 12 시간 동안 반응시켰다.

반응이 완결되면 제조된 기질들을 메탄올, 메탄올 및 물의 혼합용액(1:1 부피비), 물, 메탄올에 순차적으로 담그어 3 분 동안 초음파 세척을 하고, 진공 건조하였다.

이후, CBZ 작용기를 제거하기 위하여 실리카 기질을 트리플루오로아세트산에 담근 다음, 이를 실온에서 30 분 동안 초음파 세척하였다. 초음파 세척이 끝나면 기질을 다량의 메탄올로 세척한 다음 메탄올을 이용하여 10 분 동안 초음파 처리하였다.

상기 N-CBZ-[1]amine-[9]acid와 반응시키기 전과 후의 아미노실란 분자층의 두께 및 아민기의 표면밀도를 측정하였다. 그 결과 아미노실란 분자층의 두께는 약 8 Å 이고, 작용기의 표면밀도는 3.5 amines/nm²이다.

BEST AVAILABLE COPY

N-CBZ-[1]amine-[9]acid를 반응시킨 후의 두께는 10 Å 내외가 늘어난 18 내지 19 Å 이고, 작용기의 표면밀도는 0.18 amines/nm²로 많이 줄어든 것을 알 수 있다. 이때 반응성 아민기의 표면밀도는 9-안트라퀴논(9-anthraquinone)을 이용하였으며, 이는 예전에 사용하던 4-니트로벤즈알데히드(4-nitrobenzaldehyde)보다 물흡광계수가 6 배 가량 큰 물질이다. 표면의 아민기 밀도가 현저히 낮아지게 되므로 종래의 4-니트로벤즈알데히드로는 밀도계산이 불가능하여 9-안트라퀴논을 사용하였다.

또한 표면의 형태를 AFM(Atomic Force Microscope) 장비를 이용하여 관찰한 결과 아미노실란화된 표면의 구조와 큰 차이가 없었다. 이는 하이퍼랜치 분자가 표면에 단일층으로 형성되었음을 의미하며 덩어리가 생긴 부분이 관찰되지 않아 목표로 한 바와 같이 균일한 분자박막이 형성된 것을 뜻한다.

한편, N-CBZ-[1]amine-[9]acid가 도입된 박막의 안정성을 측정하기 위하여 중성의 물에서 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간 간격으로 초음파 세척을 하였으나 두께에는 변화가 없었다. 또한 24 시간, 48 시간을 중성의 물 속에서 방치한 뒤 측정한 두께도 역시 특별한 차이가 없었다.

다양한 pH를 가지는 물 속에서 측정한 박막의 안정성도 도 3에 나타내었다. pH 4 내지 9까지는 아주 안정한 상태를 보이다가 pH 3 보다 산성 조건에서, 그리고 pH 10 보다 염기성 조건에서는 급속히 두께가 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 결국 생리적 산성도를 포함하는 넓은 영역의 pH에서 안정함을 확인할 수 있었다.

또한 높은 온도의 물 속에서도 안정하다. 다양한 온도의 물 속에서 표면의 두께 변화를 도 4에 나타내었다. 40 °C에서 100 °C까지 10 °C 간격으로 온도를 바꾸어가며 수용액에 30 분간 담가두었으나 두께에는 차이가 없었다. 결국, 100 °C의 물 속에서 4 시간 이상 담가 두었을 때야 박막의 두께는 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 열적안정성은 바이오칩의 기질로 사용되기에 적합한 것이다.

상기 도 3 및 도 4의 두께 단위는 Å이다.

실시예 3

기질로 실리카 대신에 용융실리카를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 방법으로 기질을 처리하였다. 제조된 용융실리카 기질은 상기 실시예 2의 실리카 기질과 동일한 양상을 나타내었다.

발명의 효과

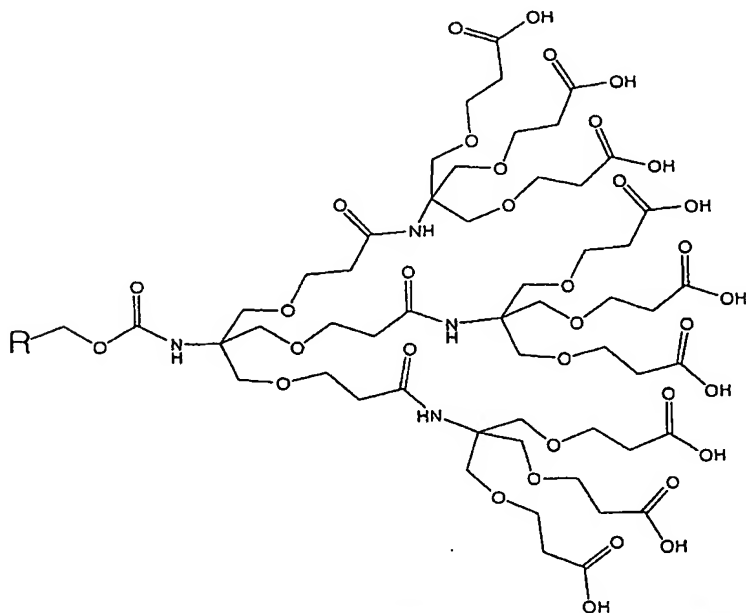
본 발명에 따르면 기질 표면에서의 아민기 밀도를 적절히 감소시킬 수 있다. 이와 같이 표면에 조절된 아민기 밀도를 갖는 고체기질은 DNA칩이나 바이오칩을 개발하는데 중요한 기능을 수행한다. 또한 본 발명에 따라 제작된 박막은 넓은 pH의 범위에서 안정하며, 높은 온도에서도 상당한 안정성을 가진다. 이것은 9 개의 카르복시산이 표면과 다중결합을 이루는 것에 기인한다. 단일결합이나 3-포인트 결합의 경우 그리 안정하지 못한 결합을 이루지만 9-포인트 결합은 이것과는 비교할 수 없을 정도의 높은 안정성을 가진다. 이밖에도 기질 표면에 원하는 분자들을 고정하고, 이들의 성질을 밝히는 표면 연구에 중요한 표면 기질로 사용이 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트라퀴논이다.

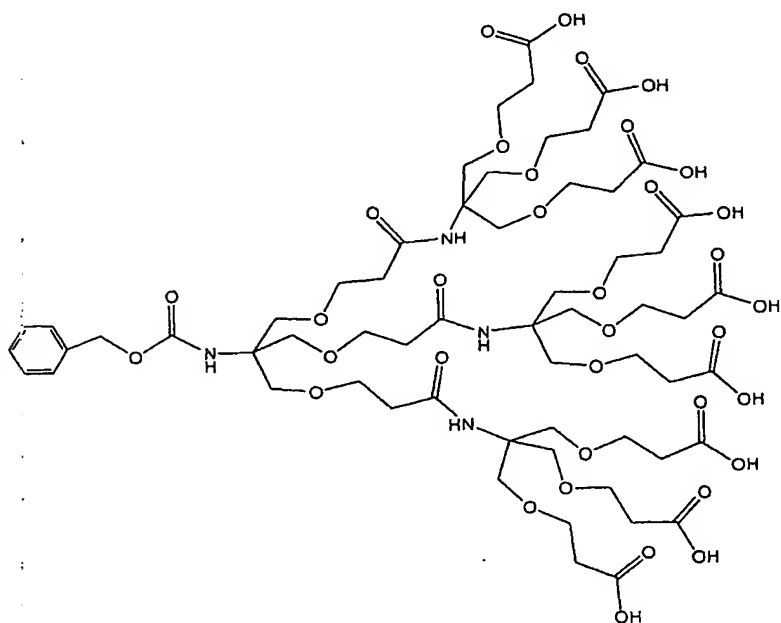
청구항 2.

제 1 항에 있어서,

하기 화학식 1a로 표시되는 N-CBZ-[1]amine-[9]acid 화합물:

BEST AVAILABLE COPY

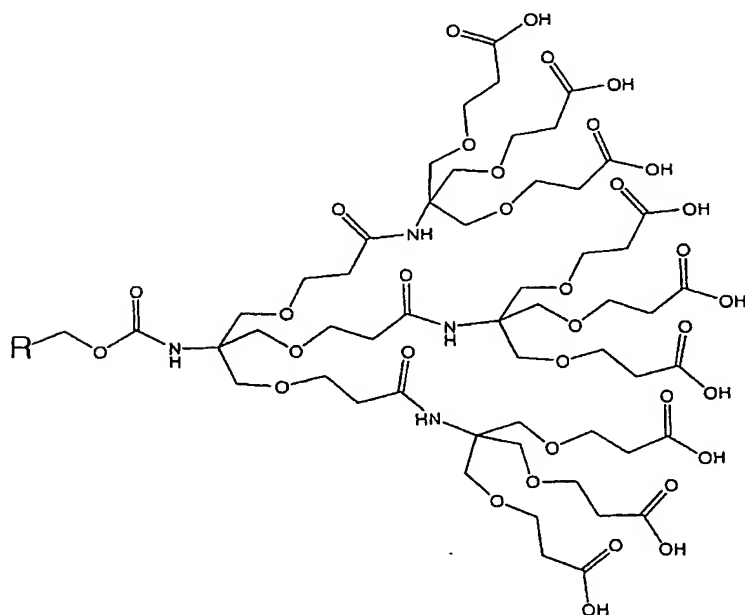
[화학식 1a]



청구항 3.

하기 화학식 1로 표시되는 카르복시산을 가지는 유도체의 제조방법에 있어서

[화학식 1]



(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴),

a) 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄과 아크릴로니트릴을 시아노에틸레이션

반응시켜서 트리스[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄을 제조하는 단계;

b) 상기 트리스[(시아노에톡시)메틸]아미노메탄에 진한 염산용액을 가하고

환류시켜서 트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄을 제조하는 단계;

c) 상기 트리스[(카르복시에톡시)메틸]아미노메탄에 메탄올의 첨가로

에스테르화 반응시켜서 트리스[[(에톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄을 제조하는 단계;

d) 상기 트리스[[(에톡시카르보닐)에톡시)메틸]아미노메탄에 하기 화학식 2

BEST AVAILABLE COPY

로 표시되는 화합물을 가하는 프로텍팅(보호) 반응에 의하여 하기 화학식

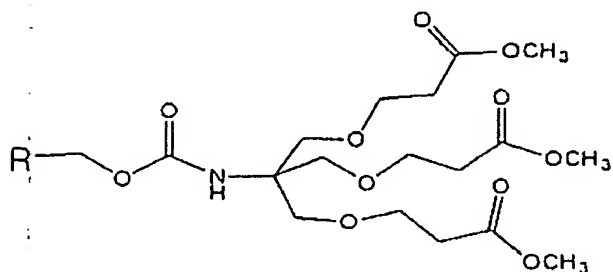
3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계

[화학식 2]

ROCOCl

(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴)

[화학식 3]

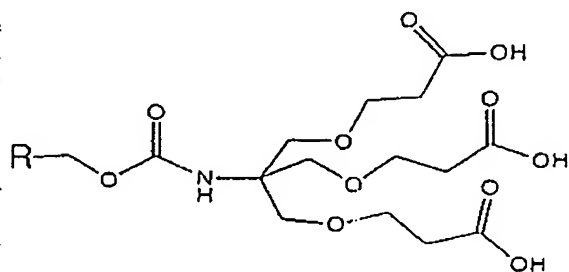


(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴);

e) 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물에 수산화나트륨 용액을 가하여 가수

분해시켜서 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계

[화학식 4]



(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴);

f) 상기 화학식 4로 표시되는 화합물과 트리스[[(메톡시카르보닐)에톡시]메

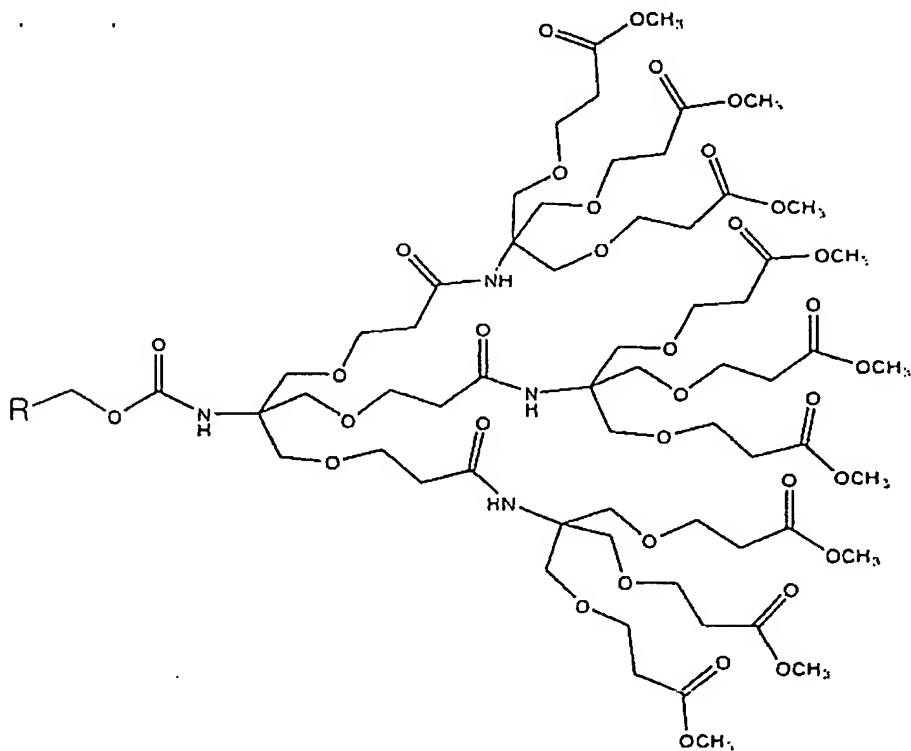
틸]아미노메탄을 디에틸포름아마이드에 녹이고, 디시클로헥실카르보디

이미드, 및 히드록시벤조트리아졸을 첨가하고 반응시켜 하기 화학식 5로

표시되는 화합물을 제조하는 단계

[화학식 5]

BEST AVAILABLE COPY



(상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴); 및

g) 상기 화학식 5로 표시되는 화합물에 수산화나트륨 용액을 가하여 가수

분해시켜서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계

를 포함하는 화학식 1로 표시되는 카르복시산을 가지는 유도체의 제조방법.

청구항 4.

제 3 항에 있어서,

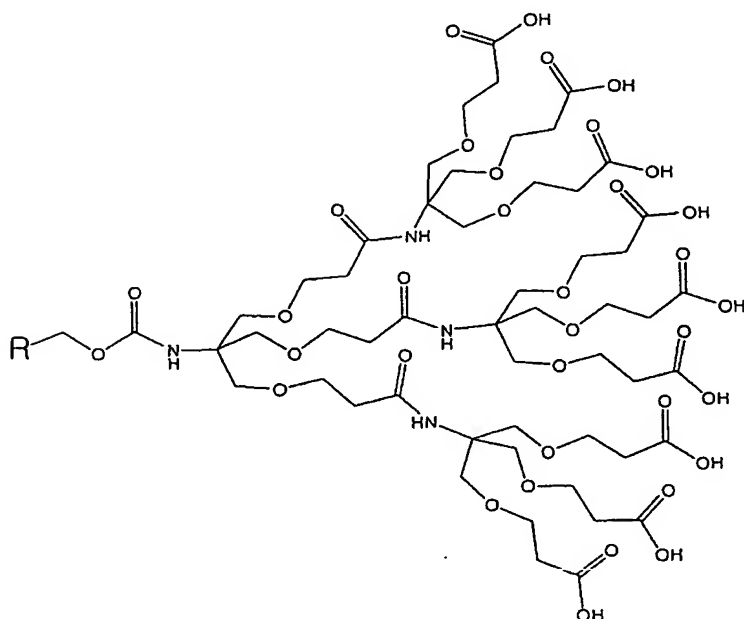
상기 d)단계의 화학식 2로 표시되는 화합물이 벤질클로로포메이트인 화학식 1로 표시되는 카르복시산을 가지는 유도체의 제조방법.

청구항 5.

BEST AVAILABLE COPY

아미노실란화된 기질표면의 아민기와 삼각뿔 형태의 하기 화학식 1로 표시되는 카르복시산을 가지는 유도체 화합물을 반응시켜 제조되는 분자층을 표면에 포함하는 기질:

[화학식 1]



상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트라릴이다.

청구항 6.

제 5 항에 있어서,

상기 기질 표면의 아민기 밀도가 0.05 내지 0.3 amines/nm²인 기질.

청구항 7.

조절된 아민기 밀도와 공간을 함유하는 분자층을 표면에 포함하는 기질의 제조방법에 있어서,

a) 아미노실란의 분자층을 표면에 포함하는 기질을 제공하는 단계; 및

b) 상기 분자층에 함유된 아민기를 카르복시산을 가지는 유도체와 반응시

키는 단계

를 포함하는 기질의 제조방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서,

상기 b)단계의 유도체가 말단에 카르복시산 및 아민 작용기를 동시에 포함하는 기질의 제조방법.

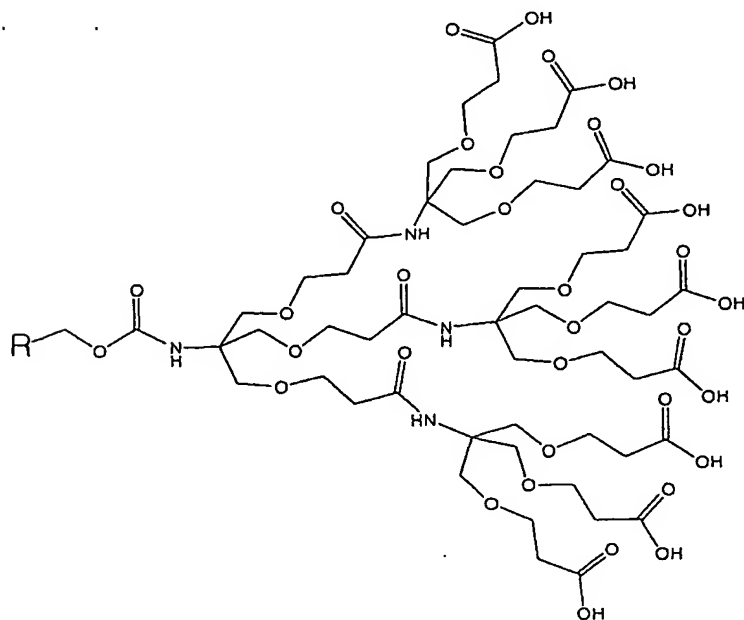
청구항 9.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,

상기 b)단계의 유도체가 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 기질의 제조방법:

[화학식 1]

BEST AVAILABLE COPY



상기 식에서, R은 페닐이거나, 니트로기, 할로겐, 또는 시아노기로 치환된 페닐, 나프틸, 또는 안트릴이다.

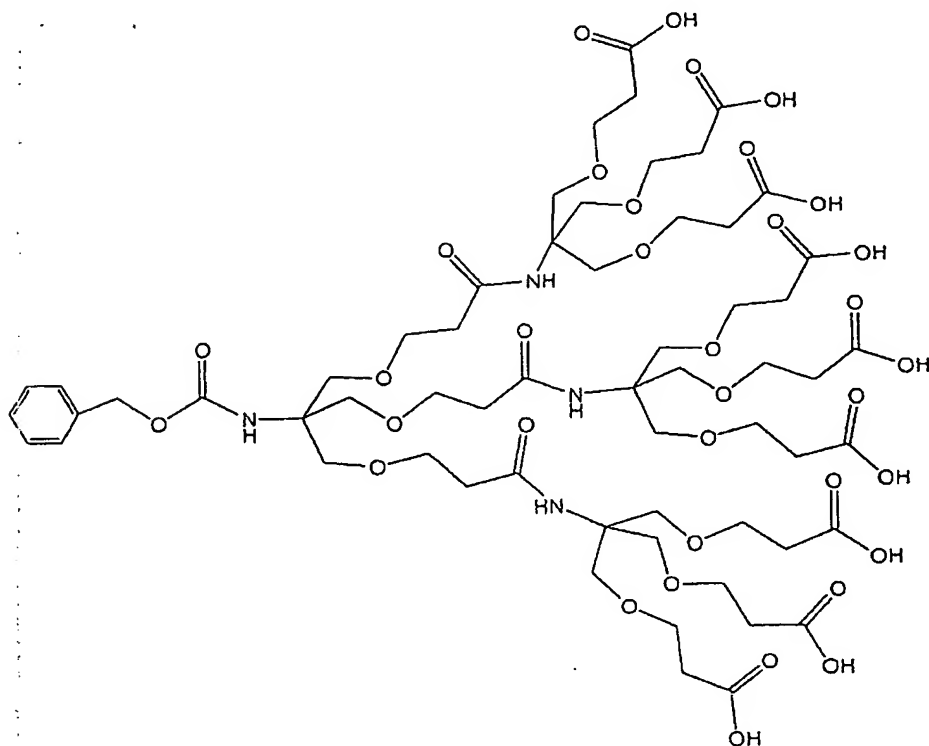
청구항 10.

제 9 항에 있어서,

상기 유도체가 하기 화학식 1a로 표시되는 N-CBZ-[1]amine-[9]acid 화합물인 기질의 제조방법:

[화학식 1a]

BEST AVAILABLE COPY



청구항 11.

제 7 항에 있어서,

상기 b)단계의 반응은 유도체가 이온결합으로 아미노실란화된 기질표면에 결합하여 박막을 형성하는 기질의 제조방법.

청구항 12.

제 7 항에 있어서,

상기 b)단계의 반응은 불활성 분위기 하에서 실시되는 기질의 제조방법.

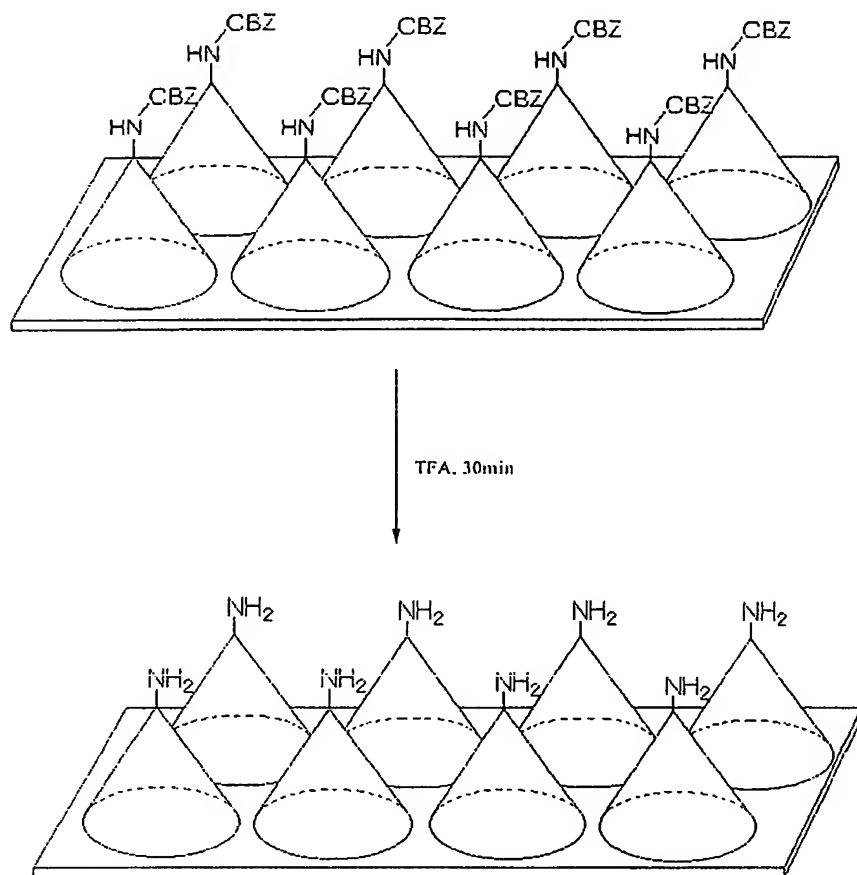
청구항 13.

제 7 항에 있어서,

c) 상기 반응된 기질의 표면층에 트리플루오로아세트산을 가하여 유도체를

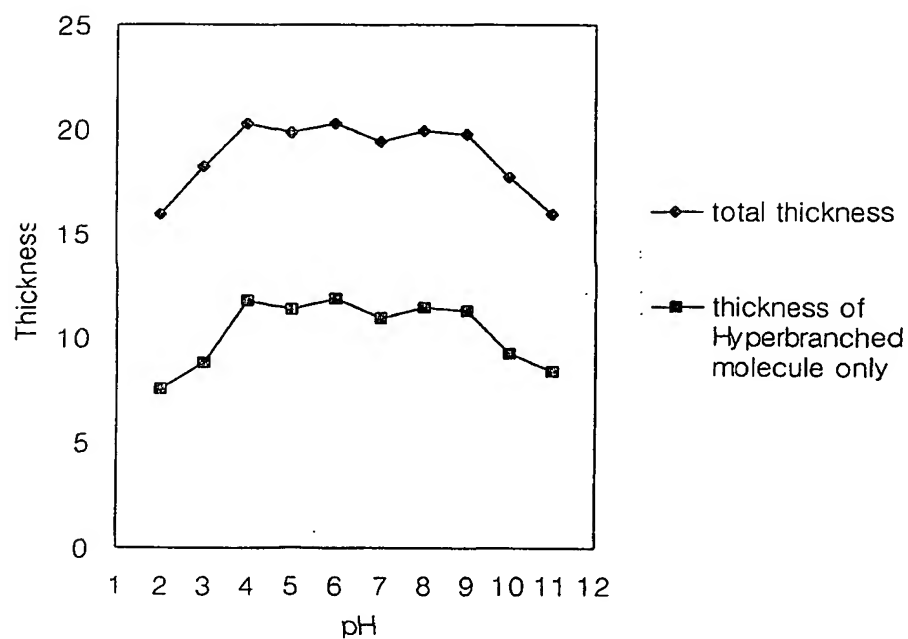
BEST AVAILABLE COPY

도면 2



도면 3

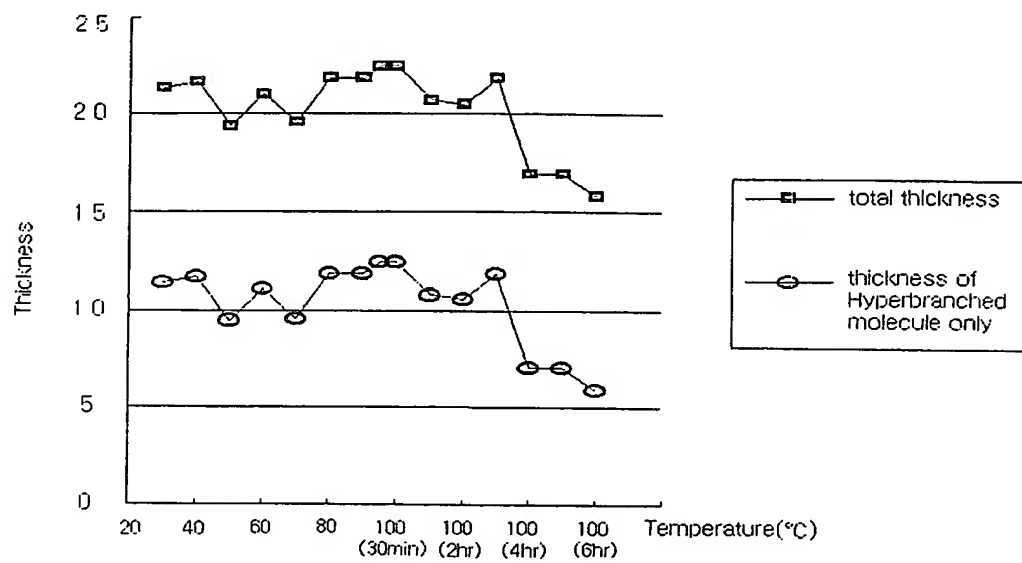
Change of Thickness vs pH



BEST AVAILABLE COPY

도면 4

Change of Thickness vs Temperature



BEST AVAILABLE COPY